

柚皮苷对糖尿病心肌病大鼠心肌超微结构和缺氧诱导因子 1 α 的影响

梁建光 吴 铿

【摘要】 目的:观察柚皮苷对糖尿病心肌病大鼠心肌超微结构及缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)表达的影响,探讨柚皮苷防治糖尿病心肌病的作用机制。 方法:将 50 只雄性 Wister 大鼠随机分为空白对照组(NC)、模型对照组(DC)和柚皮苷组(NA)。DC 组和 NA 组采用高糖高脂饲料喂养,并且在喂养 6 周后予链脲佐菌素腹腔注射行糖尿病心肌病造模。NA 组给予柚皮苷灌胃,NC 组 DC 组予生理盐水灌胃。各组每 2 周断尾采血,检测血糖、血脂、肌钙蛋白、B 型利钠肽等指标。12 周后将各组动物经心脏取血后处死,取心脏测定心重指数。制作标本用电镜观察心肌细胞超微结构,采用免疫组织化学方法检测心肌组织 HIF-1 α 表达情况。 结果:柚皮苷有较弱的降糖作用,能有效降低糖尿病心肌病大鼠总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)及心重指数,并明显减轻心肌病变,增加心肌 HIF-1 α 表达。 结论:柚皮苷可改善糖尿病心肌病糖、脂代谢,减轻心肌超微结构病变,对心肌具有保护作用,可能与其增加心肌 HIF-1 α 表达有关。

【关键词】 柚皮苷;糖尿病心肌病;缺氧诱导因子 1 α ;超微结构

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2012.02.016

Effect of naringin on myocardial ultrastructure and HIF-1 α in rats with diabetic cardiomyopathy LIANG Jian-guang, WU Keng. Department of Cardiology, affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524000, China

【Abstract】 Objective: The aim of this study was to explore the mechanism of naringin applied to the prevention and treatment of diabetic cardiomyopathy, through observing the effect of naringin on myocardial ultrastructure and HIF-1 α expression in rats with diabetic cardiomyopathy. **Methods:** Fifty males Wister rats were randomized to normal control group (NC), model control group (MC) and naringin group (NA). MC and NA were fed with high sugar and high fat diet, and were made by intraperitoneal injection of streptozotocin after 6 weeks. Then NA were lavaged with naringin, and the NC and MC were filled with saline. For each group blood samples were taken from tails every 2 weeks, then were used to detect glucose, lipids, troponin, brain natriuretic peptide (BNP). After 12 weeks, we sacrificed all rats, and determined heart weight index, cardiomyocyte ultrastructure by electron microscopy and myocardial HIF-1 α expression by immunohistochemistry. **Results:** Naringin can decrease slightly blood glucose, so it can reduce effectively TG, LDL-C and heart weight index, importantly, lessen obviously the pathological changes of cardiomyopathy and increase myocardial HIF-1 α expression in diabetic rats. **Conclusion:** Naringin can improve glucolipid metabolism and lessen the pathological changes of cardiomyopathy. It's protective mechanism was related to increased myocardial tissue HIF-1 α expression in diabetic rats.

【Key words】 Naringin; Diabetic cardiomyopathy; HIF-1 α ; Ultrastructure

糖尿病心肌病 (diabetic cardiomyopathy,

DCM)由 Hamby 等^[1]于 1974 年首次提出,是最为常见和严重的糖尿病慢性并发症之一,已经成为严重威胁人类健康的世界性公共卫生问题。DCM 的发病机制未完全明了,研究显示主要与代谢障碍、组织结构异常、心肌功能变化和自主神经功能紊乱

基金项目:广东省自然科学基金(S2011010002620)

作者单位:524001 湛江,广东医学院附属医院心血管内科

通信作者:吴 铿,Email: zjwukeng@hotmail.com.

等有关。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α) 是一种重要转录调节因子,可诱导葡萄糖转运体蛋白 1 和葡萄糖转运体蛋白 4、血管内皮细胞生长因子、促红细胞生成素及一氧化氮合酶等靶基因的转录,从而改善缺血组织能量代谢和组织的损伤^[2]。近年研究证实, HIF-1 α 在 DCM 的发生和发展中起关键作用。柚皮苷(Naringin) 又称柚甙、柑橘甙、异橙皮甙,是一种双氢黄酮类化合物,为现代生物技术提取而成的淡黄色天然色素,主要存在于芸香科(Rutaceae)柑橘属(Citrus)植物柚(citrus grandis)、葡萄柚(citrus paradesi)和酸橙(citrus aurantium)及其变种的果皮及果实中。药理学研究证实,柚皮苷具有明显的糖脂代谢调节、抗炎、抗氧化应激、改善微循环和心肌保护等作用^[3-4],但柚皮苷对 DCM 心肌组织超微结构的研究尚未见报道。本实验研究柚皮苷对 DCM 心肌组织超微结构及 HIF-1 α 表达的影响,探索柚皮苷对 DCM 的治疗机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

主要药物与试剂柚皮苷粉末(广东省梅雁蓝藻公司,纯度 98%),链尿佐菌素(美国 SIGMA 公司),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒及总胆固醇(TC)试剂盒(北京北化康东临床试剂有限公司),游离脂肪酸测定试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,编号 E1000),血糖试纸(强生医疗器材有限公司,编号 3054907)。免疫荧光定量测试剂 meter plusc cTni 测试条、meter plus BNP 测试条(美国博适),HIF-1 α 单克隆抗体试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司)。

主要仪器:血糖测试仪(美国强生),组织切片机 Leica RM2235(德国 LEICA),双目生物显微镜 Nikon YS100(日本 NIKON),OLYMPUS BX50F4 偏光显微镜、全自动显微照相系统, Triage[®]免疫荧光定量检测仪(美国博适),透射电镜(日本日立 H-600)。

1.2 实验动物

健康雄性 Wister 大鼠 36 只,体重(150 \pm 180)g, SPF 级,合格评号 SCXK 粤 2006-0015,由南方医科大学实验动物中心提供。饲养于广东医学院动物实验室,饲养条件为恒温(24 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度 50%~70%,饲养环境符合实验动物环境设施要求。

1.3 分组与模型制备

Wister 大鼠随机分为空白对照组(NC)、模型

对照组(DC)和柚皮苷组(NA)。大鼠 DCM 模型的制备:高糖高脂饲料(20%蔗糖、10%猪油、2.5%胆固醇和 67.5%基础饲料)喂养 6 周,于第 6 周一次性给予小剂量链尿佐菌素 30 mg/kg(临用前用 0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液溶解, pH 值 4.2)腹腔注射, NC 组同时采用柠檬酸缓冲液腹腔注射,腹腔注射后 72 h 后取血。测空腹血糖 >11.1 mmol/L 则认为造模成功。造模成功后,按大鼠的体表面积与成人剂量之间的换算关系计算给药量, NA 组每次给予柚皮苷 100 mg/kg 灌胃, DC 组及 NC 组以等量生理盐水灌胃。

1.4 方法

Wister 大鼠每 2 周断尾采血,以葡萄糖氧化酶法检测血糖,分离血清,用全自动生化分析仪测定三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、LDL-C 及 HDL-C。

在实验结束时,于末次给药后禁食 12 h,大鼠经腹主动脉取血,取完的血样以 3500 转/分, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,取上清液分装备用。取血后处死大鼠,迅速取出心脏,剪除包膜、血管, 4 $^{\circ}$ C 生理盐水洗净血污,滤纸吸干后称重,按心重比体重计算心重指数(g/g)。

光镜心肌组织标本制备:取心尖部右侧左室前壁小块心肌福尔马林固定后,常规脱水,石蜡切片。Harris 苏木素染色,伊红染色,乙醇脱水,透明,再经胶封等处理制成心肌组织光镜切片。用 NIKON E600 光学显微镜进行观察并拍照。

透射电镜心肌组织切片制备:取左室前壁小块心肌切成 1 mm³大小组织块,先后用 3%戊二醛及 1%锇酸固定,逐级乙醇、丙酮脱水,环氧树脂包埋切成半薄切片, HE 染色后再切成 40~60 nm 的超薄切片, 铀铅双染,透射电镜观察并拍照。

心肌组织 HIF-1 α 表达:取左室前壁心肌福尔马林固定后,常规脱水,石蜡切片。免疫组化二步法染色,以 PBS 代替一抗为阴性对照。心肌细胞内出现棕黄色物质为阳性表达,经标准灰度校正后,每个标本切片随机选取 5 个高倍视野,检测心肌组织 HIF-1 α 的表达,经图像分析仪分析,计算其平均光密度值(AOD)。免疫反应越强, AOD 越大,则表示 HIF-1 α 阳性表达越多。

1.5 统计学分析

应用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,组间比较用 *t* 检验,多组样本均数间比较采用方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 柚皮苷对 DCM 模型大鼠血糖、体重、心重的影响

与 NC 组相比较,DC 组大鼠体重明显减轻、心重指数增加($P<0.05$)。与 DC 组比较,NA 组大鼠血糖有所下降,但仍保持较高血糖水平,体重减少程度较轻,心重指数也减小,组间差异有统计学意

义(见表 1)。

2.2 柚皮苷对 DCM 模型大鼠血脂的影响

DC 组大鼠 TC、LDL-C 和 TG 显著高于 NC 组($P<0.01$);NA 组 TC、LDL-C 和 TG 均较 DC 组大鼠不同程度降低($P<0.05$),而 HDL-C 水平无明显变化(见表 2)。

表 1 各组大鼠血糖、体重、心重、心重指数的比较

组别	<i>n</i>	血糖 (mmol/L)	体重 (g)	心重 (g)	心重指数 (g/g)
NC	12	5.65 ± 0.68	183.26 ± 13.86	0.51 ± 0.10	0.00282 ± 0.00025
DC	10	19.74 ± 5.45 ⁽¹⁾	163.45 ± 10.67 ⁽¹⁾	0.56 ± 0.13 ⁽¹⁾	0.00342 ± 0.00031 ⁽¹⁾
NA	11	13.76 ± 2.54 ⁽¹⁾⁽²⁾	170.26 ± 10.86 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.54 ± 0.08 ⁽¹⁾	0.00321 ± 0.00020 ⁽²⁾

注:与 NC 组比较,⁽¹⁾ $P<0.05$;与 DC 组比较,⁽²⁾ $P<0.05$

表 2 各组大鼠血脂的比较

(mmol/L)

组别	<i>n</i>	TC	LDL-C	HDL-C	TG
NC	12	0.46 ± 0.16	0.16 ± 0.02	0.56 ± 0.06	1.17 ± 0.15
DC	10	1.26 ± 0.43 ⁽¹⁾	0.28 ± 0.10 ⁽¹⁾	0.38 ± 0.05 ⁽¹⁾	1.52 ± 0.11
NA	11	0.75 ± 0.25 ⁽²⁾	0.21 ± 0.04 ⁽²⁾	0.41 ± 0.14	1.23 ± 0.13 ⁽²⁾

注:与 NC 组比较,⁽¹⁾ $P<0.05$;与 DC 组比较,⁽²⁾ $P<0.05$

2.3 柚皮苷对 DCM 模型大鼠心肌超微结构的影响

电镜下观察 NC 组心肌纤维排列规则,心肌纤维间由闰盘相连接,闰盘清晰、连续,结构完整。胞浆充满大量纵向平行排列的肌原纤维束,I 带、A 带、H 带与 Z 线、M 线均明显易辨形成明暗相间的肌节结构。肌丝间可见成行的线粒体,其峭密集,基质密度适中,少量糖原颗粒散在分布于线粒体旁及肌丝间,基质网结构正常(见图 1NC 组)。

DC 组心肌纤维走行紊乱,闰盘扭曲模糊断裂,有处融合形成高电子密度斑块,肌节各带结构欠清晰,I 带、A 带、H 带与 Z 线、M 线模糊不清。心肌肌浆网扩张,胞浆中肌原纤维减少,走向紊乱。线粒体减少,有局灶性增生且明显肿胀,部分线粒体嵴断裂消失、膜破损。细胞核核膜不完整并呈节段性溶解消失病变,糖原颗粒明显减少。间质胶原纤维增生,间质血管内皮变薄,吞饮泡明显减少(见图 1DC 组)。

NA 组心肌纤维排列尚规则,闰盘结构及细胞核较 DC 组好。胞浆中肌原纤维束走向基本有序,线粒体形态大致正常,个别有畸形与肿胀变性,间质血管内皮改变轻微(见图 1NA 组)。

2.4 柚皮苷对 DCM 模型大鼠心肌组织 HIF-1 α 的影响

应用图象分析系统发现,NC 组基本没有表达 HIF-1 α ,DC 组及 NA 组 HIF-1 α 表达均增多,且 NA 组增多更明显($P<0.05$,见图 2)。

3 讨论

DCM 是一种特异性心肌病,左心室重构、舒张期和(或)收缩期功能障碍是其主要表现^[5]。DCM 的主要病理改变为心肌细胞肥大、凋亡、心肌纤维化和心肌微小血管广泛内膜病变^[6],导致心肌顺应性降低。DCM 心肌病理改变主要与高糖引起的糖、脂代谢紊乱有关。高血糖作为独立危险因素,直接引起心肌损害,导致 DCM^[7]。

本研究发现,给予柚皮苷干预后,DCM 大鼠心肌结构改变明显减轻,有氧代谢明显改善,表明柚皮苷能有效改善 DCM 大鼠心肌病变。DCM 组大鼠心肌组织 HIF-1 α 表达明显较正常组大鼠增多,与文献报道一致^[8]。柚皮苷干预后,DCM 大鼠心肌组织 HIF-1 α 增加。HIF-1 α 可通过调控葡萄糖转运因子 1(GLUT1)、葡萄糖转运因子 4(GLUT4)、己糖激酶(HK)等调节糖代谢的下游基因表达增加及活性增强,从而改善 DCM 心肌能量代谢。HIF-1 α 还可通过上调血管内皮生长因子(VEGF)等促

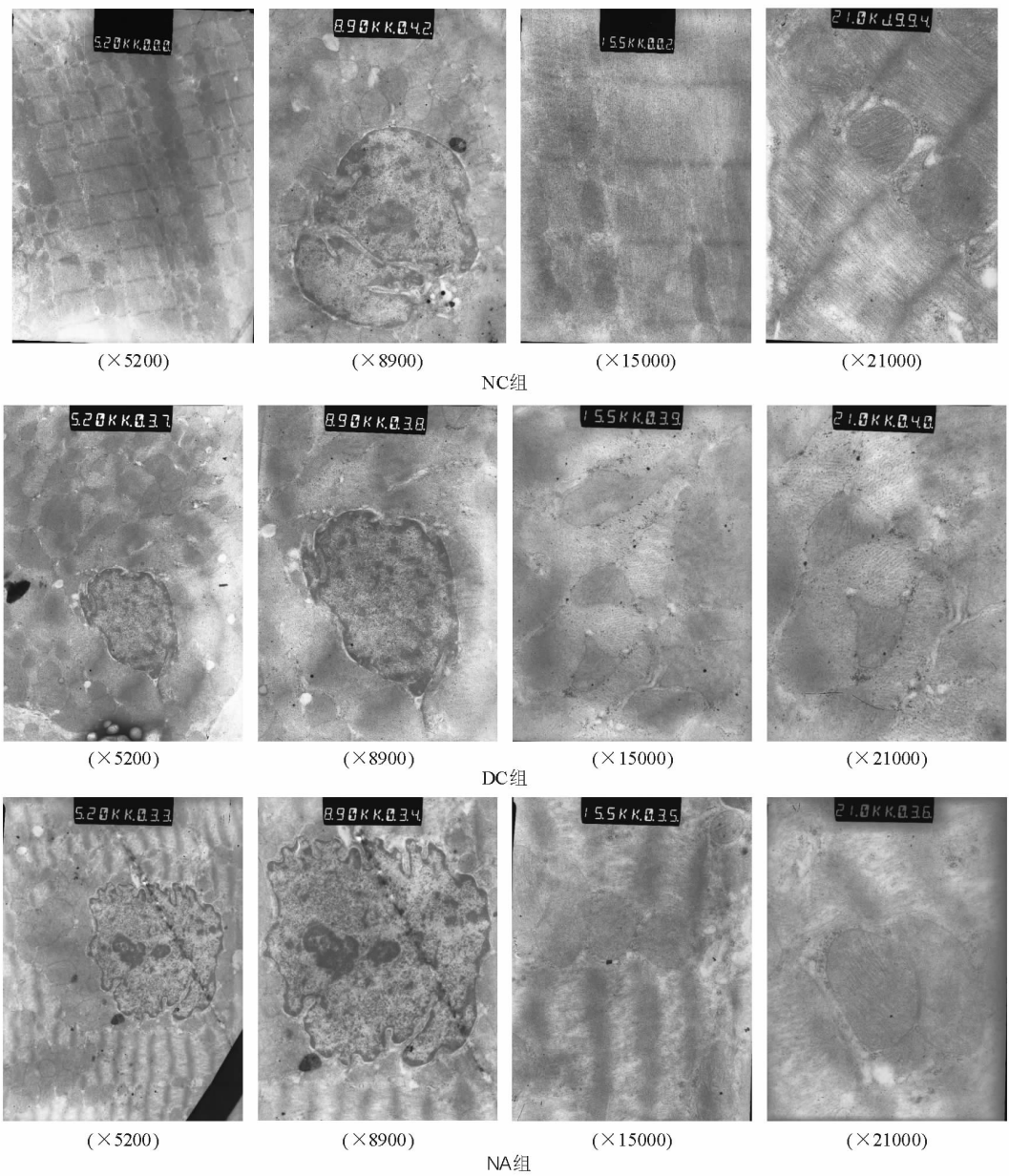


图 1 各组大鼠心肌透射电镜比较

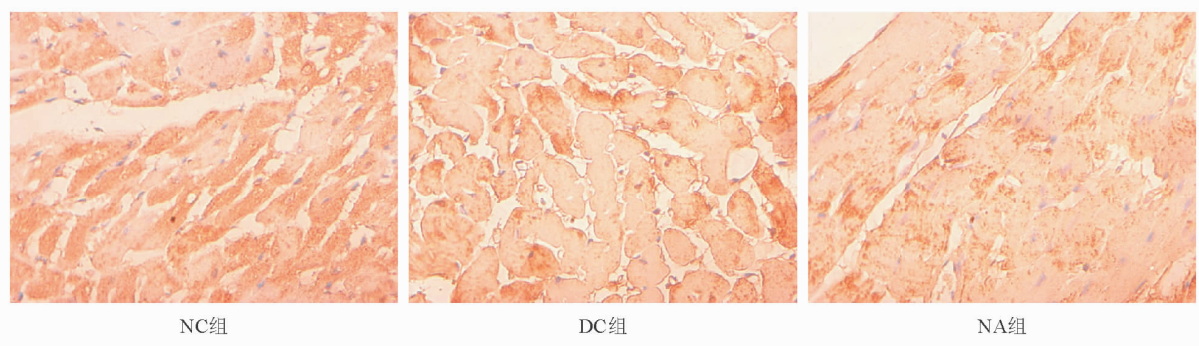


图 2 大鼠心肌组织 HIF-1α 表达光镜照片 (×200)

进血管生成基因,增加心肌毛细血管密度,使机体的代谢适应缺氧的环境,从而改善 DCM 心肌病变。

我们在猪心肌梗死模型实验中证实,HIF-1α 诱导的 VEGF 可明显促进猪梗死心肌的血管新生,改善心

肌缺血缺氧,减少心衰的发生^[9]。糖尿病患者 HIF-1 α 上调 VEGF 的作用被削弱^[10],其机制尚未清楚。Thangarajah 等^[11]证实,糖尿病患者的成纤维细胞中, HIF-1 α 与其激活因子 p300 的结合能力减弱,导致其上调 VEGF 的作用削弱有关。HIF-1 α 在 DCM 发病机制中有重要作用,多项对 HIF-1 α 的靶点治疗已在研究中。

本研究结果显示,柚皮苷对 DCM 大鼠心肌超微结构病变有明显改善作用,同时有降低 DCM 大鼠血糖及血脂作用,减轻心肌损伤,保护心脏,与目前国内外报道相一致。Jung 等^[12,13]发现,柚皮苷处理 5 周后,2 型糖尿病大鼠血糖明显降低。Kim 等^[14]研究发现,柚皮苷能降低低密度脂蛋白受体基因敲除大鼠血浆和肝脏中的 TC。我们推测柚皮苷的降糖作用可能是促进了葡萄糖的细胞内转运及肝糖原的合成,同时抑制了糖异生。另外,还可能通过抑制胆固醇的合成,促进胆固醇的排泄,抑制胆固醇的转运,从而起到降脂的作用。

本研究证实了 DCM 大鼠心肌超微结构的改变与其功能的改变明显相关,柚皮苷有上调 DCM 大鼠心肌组织 HIF-1 α 作用。柚皮苷可能通过调节糖脂代谢、改善微循环等作用减轻了 DCM 大鼠心肌病变,对 DCM 有重要的防治作用。

参 考 文 献

- [1] Hamby RI, Zoneraich S, Sherman L. Diabetic cardiomyopathy[J]. JAMA, 1974, 229(13): 1749-1754.
- [2] Wang W, Wang J, He YF. Effect of Shenmai injection on expression of hypoxia-inducible factor-1 α in hypoxic-ischemic brain damage: experiment with rats[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2009, 89(16): 1144-1147.
- [3] Kanno S, Shouji A, Tomizawa A, et al. Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages[J]. Life Sci, 2006, 78(7): 673-681.
- [4] Carino-Cortes R, Alvarez-Gonzalez I, Martino-Roaro L, et al. Effect of naringin on the DNA damage induced by daunorubicin in mouse hepatocytes and cardiocytes[J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(4): 697-701.
- [5] Shankar A, Li J, Nieto FJ, et al. Association between C-reactive protein level and peripheral arterial disease among US adults without cardiovascular disease, diabetes, or hypertension[J]. Am Hear J, 2007, 154(3): 495-501.
- [6] Okoshi K, Guimarães JF, Di Muzio BP, et al. Diabetic cardiomyopathy[J]. Arg Bras Endocrinol Metabol, 2007, 51(2): 160-167.
- [7] Nielsen LB, Bartels ED, Bolla? no E. Overexpression of apolipoprotein B in the heart impedes cardiac triglyceride accumulation and development of cardiac dysfunction in diabetic mice[J]. J Biol Chem, 2002, 277(30): 27014-27020.
- [8] 宓宇仙,倪劲松,魏义臣. HIF-1 在大鼠实验性糖尿病心脏病中的表达[J]. 临床和实验医学杂志, 2009, 8(8): 8-9.
- [9] 吴 铿,何松坚,叶少强,等. 主动脉内球囊反搏对猪急性心肌梗死后血管内皮新生因子及血管新生作用的研究[J]. 中国心血管病研究, 2011, 9(9): 696-701.
- [10] Kajiwar H, Luo Z, Belanger AJ, et al. A hypoxic inducible factor-1 α hybrid enhances collateral development and reduces vascular leakage in diabetic rats[J]. J Gene Med, 2009, 11(5): 390-400.
- [11] Thangarajah H, Yao D, Chang EI, et al. The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(32): 13505-13510.
- [12] Jung UJ, Lee MK, Jeong KS, et al. The Hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice [J]. J Nutr, 2004, 134(10): 2499-2503.
- [13] Jung UJ, Lee MK, Park YB, et al. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose re-gulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(7): 1134-1145.
- [14] Kim HJ, Oh GT, Park YB, et al. Naringin alters the cholesterol biosynthesis and antioxidant enzyme activities in LDL receptor-knockout mice under cholesterol fed condition [J]. Life Sci, 2004, 74(13): 1621-1634.

(收稿:2011-10-20 修回:2012-01-04)

(本文编辑:丁媛媛)